

GC-MS/MS 法测定甲磺酸卡莫司他原料药中 *N*-亚硝基二甲胺

韦学明¹, 丁文字^{2,3*}, 雷勇胜^{2,3}, 张慕军^{2,3}, 穆 帅^{2,3}, 陈 蔚^{2,3}, 潘 毅^{2,3}

1. 天津市人民医院, 天津 300121

2. 天津药物研究院有限公司 原料药研发中心, 天津 300193

3. 天津泰普制药有限公司 技术研发中心, 天津 300193

摘要: 目的 建立 GC-MS/MS 法测定甲磺酸卡莫司他原料药中的亚硝胺类基因毒性杂质 *N*-亚硝基二甲胺 (NDMA)。方法 采用 Agilent DB-SELECT 624UI 色谱柱 (30 m×0.32 mm×1.80 μm) 色谱柱, 离子源为 EI 源, 采用多反应监测模式, 以 *m/z* 74→44.2 为定量离子, *m/z* 74→42.2 为定性离子, 进行数据采集。结果 NDMA 在 12.571 2~100.569 6 ng/mL 线性良好 ($r=0.997\ 6$), 检测限质量浓度为 5.028 5 ng/mL, 平均回收率为 107.4%, RSD 值为 2.5%。结论 该方法操作简单, 灵敏度高, 专属性和重复性好, 可用于甲磺酸卡莫司他原料药中 NDMA 的检测。

关键词: 甲磺酸卡莫司他; NDMA; GC-MS/MS

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)05-0897-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.05.007

Determination of *N*-nitrosodimethylamine in camostat mesylate active pharmaceutical ingredients by GC-MS/MS

WEI Xue-ming¹, DING Wen-yu^{2,3}, LEI Yong-sheng^{2,3}, ZHANG Mu-jun^{2,3}, MU Shuai^{2,3}, CHEN Wei^{2,3}, PAN Yi^{2,3}

1. Tianjin Union Medical Center, Tianjin 300121, China

2. API R&D Center, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Co., Ltd, Tianjin 300193, China

3. Technology R & D Center of Tianjin Taipu Pharmaceutical Co., Ltd, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish a GC-MS/MS method for determination of genotoxic impurity *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) in camostat mesylate active pharmaceutical ingredients. **Methods** NDMA was determined by GC-MS/MS method with Agilent DB-SELECT 624UI column (30 m × 0.32 mm × 1.8 μm). The mass spectrometer was operated in the electron impact ionization (EI) fixed mode, and the ion collection mode was multiple reaction monitoring (MRM). The ion for quantitative was *m/z* 74 → 44.2, and for qualitative was *m/z* 74 → 42.2. **Results** NDMA had a good linear relationship 12.571 2 — 100.569 6 ng/mL with $r = 0.997\ 6$. The limit of detection (LOD) was 5.028 5 ng/mL. The average recovery was 107.4% with RSD value 2.5 %. **Conclusion** The method is convenient sensitive, specific, and reproducible, which is suitable for determination of NDMA in camostat mesylate active pharmaceutical ingredients.

Key words: camostat mesylate; NDMA; GC-MS/MS

甲磺酸卡莫司他片在 1985 年于日本上市, 是一种口服非肽类蛋白抑制剂, 临床主要用于慢性胰腺炎的治疗。研究发现跨膜丝氨酸蛋白酶 2 抑制剂可在体外抑制新型冠状病毒入侵细胞, 进而达到治疗和预防新型冠状病毒肺炎的作用^[1]。甲磺酸卡莫司他作为代表药物, 受到了广泛关注。根据工艺路线^[2], 在得到产物甲磺酸卡莫司他后, 需精制去除

其他盐类杂质, 其中会使用到 *N,N*-二甲基甲酰胺作为溶剂, 可能引入基因毒性杂质 *N*-二甲基亚硝胺 (NDMA)。根据 ICH M7^[3], NDMA 为 *N*-亚硝胺化合物, 属于“关注的列队”, 具有较高致癌风险, 应对其含量进行检测并严格控制。NDMA 分子式为 C₂H₆N₂O, 结构见图 1。作为一种备受关注的基因毒性杂质, 很多国家和地区发布了相关检测方法。

收稿日期: 2021-01-18

作者简介: 韦学明, 男, 大专, 药剂师。E-mail: 13920572366@163.com

*通信作者: 丁文字, 女, 助理研究员, 硕士。E-mail: dingwy@tjipr.com

目前一般采用高效液相色谱法或气相色谱法进行检测,为达到较高的灵敏度,多采用质谱检测器^[4-7]。本研究根据待测样品性质,采用 GC-MS/MS 法对甲磺酸卡莫司他原料药中 NDMA 进行了检测。

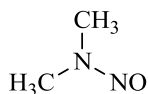


图1 NDMA 结构式

Fig. 1 Structure of NDMA

1 仪器与试剂

Agilent 7697A & 7890B & 7000D 三重四极杆气质联用系统 (MassHunter 工作站, 美国 Agilent 公司); Mettler XS205DU 十万分之一电子天平 (瑞士梅特勒公司)。NDMA 对照品 (质量分数 > 99.0%, 批号 R5V6K-HR) 购于 TCI 公司, 甲磺酸卡莫司他原料药 (批号 TY2020-1-20200401、08202005001、08202005002、08202005003、08202007004、08202007005) 为天津泰普制药有限公司生产, N-甲基吡咯烷酮 (NMP) 为顶空专用级别, 购于百灵威科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Agilent DB-SELECT 624UI 色谱柱 (30 m × 0.32 mm × 1.80 μm); 以氦气为载气, 体积流量 2.0 mL/min; 升温程序: 40 °C, 保持 5 min, 以 4 °C/min 升至 70 °C, 保持 4 min, 以 40 °C/min 升至 230 °C, 保持 5 min; 进样口温度为 220 °C; 采用顶空进样, 顶空温度 130 °C, 平衡 10 min, 分流比为 5:1。

2.2 质谱条件

离子源采用 EI 源, 温度 230 °C, 电离能量 70 eV, 传输线温度 280 °C, 采集模式为多反应监测 (MRM), 母离子 m/z 为 74, 定性离子 m/z 为 74 → 42.2, 碰撞能量 18 eV, 定量离子 m/z 为 74 → 44.2, 碰撞能量 5 eV。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品约 25 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 NMP 稀释至刻度, 摇匀; 取上述溶液 0.1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加 NMP 稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品储备液。取对照品储备液 2.4 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加 NMP 稀释至刻度, 摇匀。精密量取 1 mL, 置 10 mL 顶空瓶中,

密封, 即得对照品溶液 (质量浓度为 48 ng/mL)。

2.3.2 供试品溶液的制备 取甲磺酸卡莫司他样品约 300 mg, 精密称定, 置 10 mL 顶空瓶中, 加 NMP 1 mL, 密封, 即得。

2.3.3 加样溶液的制备 取甲磺酸卡莫司他样品约 300 mg, 精密称定, 置 10 mL 顶空瓶中, 加 NMP 对照品溶液 1 mL, 密封, 即得。

2.4 系统适用性试验

取对照品溶液, 按上述条件进行测定, 平行 6 份。结果表明, NDMA 保留时间的 RSD 值为 0.04%, 峰面积的 RSD 值为 5.9%, 说明该方法的系统适用性良好。

2.5 专属性试验

取对照品溶液、供试品溶液和加样溶液, 另取 NMP 1 mL, 置 10 mL 顶空瓶中, 密封, 作为空白溶液。分别按以上条件进行测定, 定量离子的色图谱见图 2。结果表明, 空白基线稳定, 且样品热稳定性较好, 无干扰检测的降解产物, 目标物与其他峰均能良好分离, 方法专属性良好。

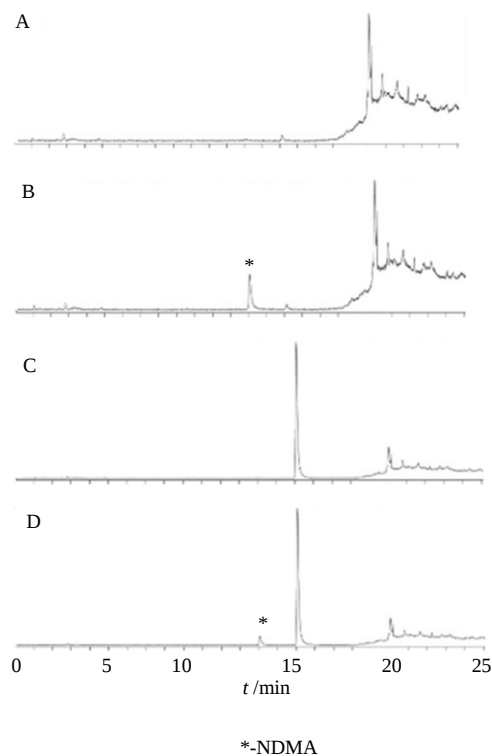


图2 空白溶液 (A)、对照品溶液 (B)、供试品溶液 (C) 和加样溶液 (D) 的定量离子色谱图

Fig. 2 Quantitative ion chromatograms of blank (A), standard solution (B), sample solution (C), and spiked sample solution (D)

2.6 检测限和定量限试验

取对照品溶液逐级稀释并检测,记录色谱图。当信噪比大于10时作为定量限溶液,并重复测定6次,信噪比大于3时作为检测限溶液。结果表明:NDMA的定量限浓度为12.571 2 ng/mL,相当于样品质量分数0.04 μg/g,6针峰面积的RSD值为5.2%;检测限浓度为5.028 5 ng/mL,相当于样品质量分数0.016 μg/g,能够满足检测需求。

2.7 线性关系考察

取对照品储备液逐级稀释,分别得到质量浓度为12、24、36、48、72、96 ng/mL的溶液,作为线性系列溶液。分别进样测定,记录峰面积,并进行线性回归。结果表明在12.571 2~100.569 6 ng/mL (LOQ~200%)时NDMA质量浓度与峰面积呈良好的线性关系,线性方程为 $Y=233.520\ 892\ X-773.778\ 378$ ($r=0.997\ 6$)。

2.8 稳定性试验

取甲磺酸卡莫司他原料药样品(批号TY2020-1-20200401)和NDMA对照品,于同一时间配制对照品溶液和供试品溶液,于常温静置,分别在0、1、5、12、19、33 h进样测定,记录峰面积,结果对照品溶液中NDMA峰面积的RSD值为5.7%,供试品溶液中未检出NDMA。说明溶液在33 h内稳定。

2.9 重复性试验

取甲磺酸卡莫司他原料药样品(批号TY2020-1-20200401),平行配制6份加样溶液,作为精密度溶液。进样测定,记录峰面积,按外标法计算NDMA质量分数。结果显示精密度溶液中NDMA质量分数的RSD值为2.4% ($n=6$)。

2.10 回收率试验

精密量取NDMA对照品储备液适量,加NMP进行稀释,得到质量浓度分别为38.4、48.0、57.6 ng/mL的回收率储备溶液。取甲磺酸卡莫司他原料药样品(批号TY2020-1-20200401)约300 mg,精密称定,置10 mL顶空瓶中,共9份,分为3组,分别精密加入38.4、48.0、57.6 ng/mL回收率储备溶液1 mL,制备供试溶液,进样测定,记录色谱图,并根据NDMA峰面积计算回收率,结果NDMA的平均回收率为107.4%,RSD值为2.5%。

2.11 方法耐用性考察

在上述检测条件下,分别改变离子源温度(230 ± 2)℃、进样口温度(220 ± 5)℃、顶空温度(130 ± 2)℃、载气体积流量(2.0 ± 0.1) mL/min,

进样空白溶液、对照溶液和加样溶液,结果表明,各耐用性条件下溶液中NDMA质量分数的RSD值均不大于8% ($n=6$),证明试验条件的微小变化对样品检测无明显影响,方法耐用性良好。

2.12 样品测定

按照上述检测方法,对甲磺酸卡莫司他原料药样品(批号为TY2020-1-20200401、08202005001、08202005002、08202005003、08202007004、08202007005)进行NDMA的检测,记录峰面积,按外标法计算NDMA的质量分数,结果表明6批样品中均未检出NDMA。

3 讨论

3.1 NDMA限度的确定

根据ICH M7, N-亚硝胺化合物的可接受摄入量计算依据应为研究设计完善的致癌性试验中的最低TD₅₀值来计算,或与人类风险评估最相关的种属、性别和肿瘤发生器官部位的最低TD₅₀值。参考《化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则(试行)》^[8],NDMA的最大摄入量约为96 ng/d。甲磺酸卡莫司他的最大日剂量为600 mg,计算得到NDMA的限度阈值为0.16 μg/g,该限度可有效排除潜在基因毒性物质的危害。

由于甲磺酸卡莫司他的沸点较高,在气相体系中无法完全气化,为保证仪器稳定和检测的准确性,采用顶空进样法进行检测。经试验后确定样品浓度定为300 mg/mL,此时对照品溶液质量浓度为48 ng/mL,定量限相当于对照品溶液质量浓度的25%,能满足检测灵敏度要求。”

3.2 色谱柱选择

分别采用极性色谱柱和中等极性色谱柱进行检测。极性色谱柱(Agilent DB-WAX)在大多数文献中被推荐使用。试验发现使用该色谱柱检测时,NDMA峰与DMF峰位置重合,由于两者结构非常相似,DMF具有与NDMA m/z 一致的同位素(m/z 74.06),且具有相同的碎片离子峰,无论在全扫描(scan),单离子检测模式(SIM)或多反应检测模式(MRM)下均会对NDMA检测产生干扰。本实验中,样品精制过程中使用DMF,其含量远高于NDMA限度,因此Agilent DB-WAX不适用于本品的检测。经试验,在色谱柱Agilent DB-SELECT 624UI (30 m×0.32 mm×1.80 μm)中NDMA与DMF能很好地分离,且峰型较好,保留时间适中,确定采用该色谱柱进行检测。

3.3 质谱条件的优化

在全扫描(Scan)模式下对NDMA溶液进行测定,确定NDMA主要碎片离子为 m/z 74.0。在Scan模式、SIM模式下的背景干扰都比较大,检测灵敏度无法达到要求,因此选择MRM模式进行检测。以 m/z 74为母离子,对碰撞能量、二级碎片离子进行筛选,选择响应最高的离子作为定量离子、定性离子,最终确定了MRM参数。在MRM模式下,基线噪音明显低于SIM模式,测定灵敏度有显著提高。

3.4 色谱条件的优化

对样品溶剂进行筛选,参考现有文献和样品溶解度,分别采用水、DMSO、NMP配制NDMA溶液进行检测,结果表明NDMA在除NMP外其他溶液中响应均会随时间发生不同程度的衰减,因此采用NMP作为溶剂。

对顶空平衡条件进行筛选,结果表明顶空温度、平衡时间均对NDMA响应有较明显的影响。在一定范围内NDMA响应随平衡温度升高增加,随着平衡时间延长减小,综合考虑后确定采用130℃,10 min的顶空平衡条件。

本法灵敏度高,无需内标,检测无干扰,且样品不需前期处理,不需加入内标,耐用性好,可用于控制甲磺酸卡莫司他原料药中亚硝胺类基因毒性杂质NDMA。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张黎,王佑春,黄维金. 跨膜丝氨酸蛋白酶2在病毒感染中的作用及其抑制剂的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2020, 48(3): 66-72.
- [2] Sugano H. Preparation of camostat mesylate as pharmaceuticals for treatment of pancreatitis [Z]. Junsei Chemical Co., Ltd. 1997.
- [3] ICH guideline M7 on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk [S]. M7(R1). 2017.
- [4] 国家药典委员会. 关于缬沙坦国家标准修订稿的公示(第二次) [EB/OL]. (2019-01-02) [2021-01-16]. <https://www.chp.org.cn/gjydw/hxyp/5182.jhtml>
- [5] FDA. Combined headspace *N*-nitrosodimethylamine (NDMA), *N*-nitrosodiethylamine (NDEA), *N*-nitrosoethylisopropylamine (NEIPA), and *N*-nitrosodiisopropylamine (NDIPA) impurity assay by GC-MS/MS [EB/OL]. (2019-04-11) [2021-01-10]. <https://www.fda.gov/media/123408/download>
- [6] 姜俊,邹韵,孙丽鹏,等. 顶空气相色谱质谱联用测定厄贝沙坦中遗传毒性杂质 *N*-亚硝基二甲胺和 *N*-亚硝基二乙胺 [J]. 分析试验室, 2020, 39(2): 245-248.
- [7] FDA. Combined *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) and *N*-nitrosodiethylamine (NDEA) impurity assay by GC/MS-headspace [EB/OL]. (2019-01-28) [2021-01-10]. <https://www.fda.gov/media/117843/download>
- [8] 化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则(试行) [EB/OL]. (2020-05-08) [2021-01-10]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20200508160101122.html>

【责任编辑 解学星】